

(43) 国際公開日  
2004年7月29日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/063371 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 11/00, C07K 14/01,  
19/00, C12P 21/02, G01N 33/53, 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000032

(22) 国際出願日: 2004年1月7日 (07.01.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-005099 2003年1月10日 (10.01.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社  
プロテインクリスタル (PROTEIN CRYSTAL CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒5410053 大阪府大阪市中央区本町1丁目  
1番3号 本町橋西ビル 10階 Osaka (JP).

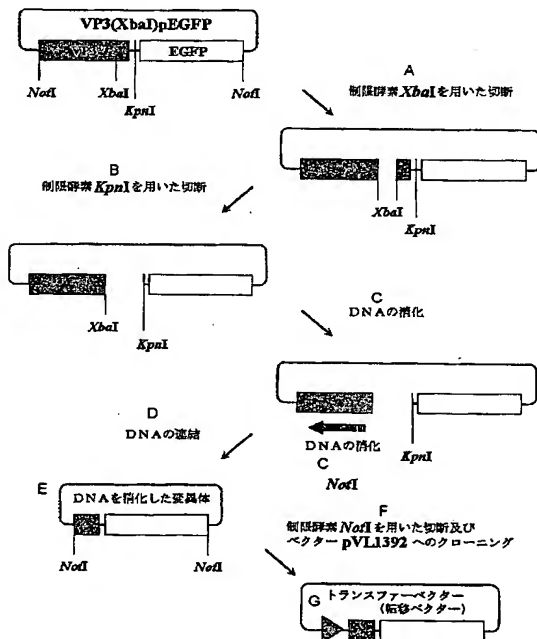
(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池田 敬子  
(IKEDA, Keiko) [JP/JP]; 〒6060964 京都府京都市左京  
区松ヶ崎修理式町1-2-C Kyoto (JP).(74) 代理人: 須藤 阿佐子, 外 (SUDO, Asako et al.); 〒  
1840002 東京都小金井市梶野町5-6-26 Tokyo  
(JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN COMPLEX, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: タンパク質複合体及びその製造方法並びにその用途



A...CLEAVAGE BY RESTRICTION ENZYME XbaI  
B...CLEAVAGE BY RESTRICTION ENZYME KpnI  
C...DIGESTION OF DNA  
D...LIGATION OF DNA  
E...MUTANT WITH DIGESTED DNA  
F...CLEAVAGE BY RESTRICTION ENZYME NotI AND CLONING INTO  
VECTOR pVL1392  
G...TRANSFER VECTOR (VECTOR FOR TRANSFERAL)

(57) Abstract: It is intended to provide a protein complex and a production process whereby the protein complex can be efficiently produced without lowering its function. It is also intended to provide use of the protein complex in a biosensor, an immobilized enzyme and so on. A protein complex comprising a polyhedral protein having an insect virus encapsulated therein and a desired protein having a restricted region of a coat protein VP3 of cytoplasmic polyhedrosis virus (more specifically speaking, either the region from the N-terminus to the 40-th amino acid residue or the region from the 41-st amino acid residue to the 79-th amino acid residue) as an embedded polyhedral signal, and a process for producing the same. The polyhedral protein contributes to the improvement in the stability of the target protein, the protection thereof or the improvement in the conservation properties thereof, or a combination of any of these effects. The target protein is at least one member selected from the group consisting of fluorescent or light-emitting proteins, enzymes, antigens, antibodies, cytokines, receptors and physiologically active proteins. A biosensor characterized in that the above-described protein complex is arranged in dots or lines on a substrate and immobilized thereon.

(57) 要約: タンパク質複合体およびその機能を低下させることなく効率よく生産し得る製造方法の提供。タンパク質複合体を利用したバイオセンサー、固定化酵素などの用途の提供。昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質VP3の限定された領域、具体的には、N末端から40アミノ酸残基までと41アミノ酸残基から79アミノ酸残基までのいずれかの範囲にある領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質とからなるタンパク質複合体およびその製造方法。多角体タンパク質は目的タンパク質に対して安定性向上または保護または保存性向上または、それらのいずれかの組み合わせ効果をもたらしている。目的タンパク質は、蛍光または発光機能を有するタンパク質、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、受容体、および生理活性タンパク質からなる群から選ばれた少なくとも1種である。上記のタンパク質複合体を基盤上

[続葉有]



BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

タンパク質複合体及びその製造方法並びにその用途

5

## 技術分野

この発明は、タンパク質複合体及びその製造方法並びにタンパク質複合体を用いたバイオセンサ・固定化酵素等の用途に関する。

10

## 背景技術

15

従来から、タンパク質をタンパク質で包みこんだいわゆるタンパク質複合体は知られている。この種タンパク質複合体の作製には、例えば、結晶状のタンパク質の表面に溶解したタンパク質溶液を塗布する方法が考えられる。

20

しかし、この方法では、結晶状のタンパク質を溶解せずに行うことが極めて困難であった。このため、上記方法は、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、受容体などの有用なタンパク質（以下、目的タンパク質という）を保護する目的ではほとんど採用されていないのが実情である。

25

目的タンパク質の保護には、多糖類高分子やポリエチレングリコールなどの高分子を目的タンパク質に共有結合させる方法が採用されている。この方法は、目的タンパク質のアミノ基やカルボニル基などの官能基に温和な反応条件で高分子を結合させるものである。しかし、この方法では、目的タンパク質の結合部位、触媒部位などの制御が出来なかった。また、結合部位や触媒部位などが目的タンパク質の種類によって異なる

非特許文献 1 Ikeda et al. (2001) J. Virol. 75, 988-995

#### 発明の開示

5 本発明は、上記発明をさらに改良して、多角体包埋シグナルとなるVP3を特定範囲に同定することにより、完成したものである。

本発明は、サイズ（分子量）を大きくした目的タンパク質、また蛍光または発光機能や生理活性機能を有する目的タンパク質、さらに高分子性の目的タンパク質を包囲可能にし、また、複合体の状態で目的タンパク質の機能を検証可能にしたタンパク質複合体を提供することを目的とする。

また、本発明は、種類の性質を有する目的タンパク質を包囲したタンパク質複合体の機能を低下させることなく効率よく生産し得る製造方法を提供することを目的とする。

15 さらに、本発明は、タンパク質複合体を利用したバイオセンサー、固定化酵素などの用途を提供することを目的とする。

本発明は、昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質VP3の限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質とからなるタンパク質複合体を要旨とする。

VP3の限定された領域が、N末端から40アミノ酸残基までと41アミノ酸残基から79アミノ酸残基までのいずれかの範囲にあり、その場合、本発明は、昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質のVP3のN末端から40アミノ酸残基までと41アミ

関係によるものであることがわかっている（非特許文献1）。

本発明者は、上述の背景技術に鑑みて、目的タンパク質の保護、保存、安定性向上に寄与するタンパク質複合体及びその製造方法に関する発明を完成し、先に出願した（特許文献1）。上記発明の明細書は、この多角体の中に高分子性の目的タンパク質を包埋させ、またその包埋効率を高めることを目的とする。そこで、細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質をコードする遺伝子を短くすることにより、多角体の中に包埋させることができるタンパク質のサイズ（分子量）を大きくし、さらに効率良く多角体の中にこの目的とするタンパク質を包埋させる。さらにその手段として目的タンパク質のN末端またはC末端に細胞質多角体病ウイルスの外層を構成するタンパク質であるVP3のアミノ酸配列を導入し、この融合タンパク質をバキュロウイルスベクターで発現させるが、この際、細胞質多角体病ウイルスの多角体タンパク質を発現するウイルスと共に、昆虫細胞に感染させることにより、多角体中に融合タンパク質が包埋される。このため、バキュロウイルスベクターで発現させた外来タンパク質、すなわち目的タンパク質が、細胞質多角体病ウイルスの構成タンパク質のN末端またはC末端に挿入されるように、細胞質多角体病ウイルスの構成タンパク質をコードするcDNAと目的タンパク質遺伝子とを融合させる必要がある。この際、構成タンパク質と目的タンパク質遺伝子のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームがインフレームになるようにすることが重要であり、このようにして細胞質多角体病ウイルスの構成タンパク質と目的タンパク質を一つの融合タンパク質として発現させる組み換えバキュロウイルスが形成される、ということ

5

10

15

20

25

ため、すべての目的タンパク質に適用することが出来なかった。

目的タンパク質の保存には、一般に、低温度で保存する方法が行われている。また、目的タンパク質に、その構造を安定化させる機能がある  
5 と期待される保護物質（例えば、多糖類高分子、ポリエチレングリコールなど）を添加、混合する方法も行われている。しかし、これらの方法による時は、外的要因である環境の変化によって、目的タンパク質の安定性や機能が損なわれることがあった。というのは、もし周辺への水の出現、温・湿度の上昇、結露などが生じると、目的タンパク質が保護物  
10 質とともに容易に溶解するからである。また、もし細菌やカビなどの腐敗菌が存在、侵入または発生すると、目的タンパク質が保護物質とともに分解・捕食されるからである。よって、目的タンパク質が一部の酵素や抗体のタンパク質分子のような高分子のタンパク質のときには、その一部でも構造上に変化を受けたり、タンパク質分解酵素の働きによって  
15 その一部が分解されると機能が完全に失われる。しかし、目的タンパク質を用いる時には、その機能を十分に有していることが必須条件である。このため、保存状態の目的タンパク質の安定性を個々に検証しなければならないが、従来技術による時は、目的タンパク質を保護物質から取り出さなければならず、このために手数がかかるばかりか目的タンパク質  
20 が変性しやすいことがある。

所で、細胞質多角体病ウイルスは感染の後期に、その感染細胞において多角体タンパク質からなる多角体を形成し、その中に多数のウイルス粒子を包埋する。

25 この多角体の中にウイルス粒子が特異的に入る理由は、同ウイルス粒子の外殻タンパク質であるVP3と多角体タンパク質との間での特異的な

上または、それらのいずれかの組み合わせ効果をもたらしているタンパク質複合体を要旨とする。

また、本発明は、目的とするタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだベクターを、多角体タンパク質遺伝子を組み込んだベクターとともに細胞に感染させた後、この細胞を培養して、その中で目的とするタンパク質と多角体タンパク質からなる複合構造のタンパク質複合体を製造するタンパク質複合体の製造方法を要旨とする。

さらにまた、本発明は、昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質の限定された領域、具体的にはVP3のN末端から40アミノ酸残基までと41アミノ酸残基から79アミノ酸残基までのいずれかの範囲にある限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質、具体的には蛍光または発光機能を有するタンパク質、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、受容体、および生理活性タンパク質からなる群から選ばれた少なくとも1種である目的タンパク質とからなるタンパク質複合体、好ましくは多角体タンパク質が目的タンパク質に対して安定性向上または保護または保存性向上または、それらのいずれかの組み合わせ効果をもたらしているタンパク質複合体を基盤上にドット状または線上に配列、固定したことを特徴とするバイオセンサー、または該タンパク質複合体が基盤上に形成した凹み検体液中の物質と接触が可能であるように充填されていることを特徴とするバイオセンサー、または該タンパク質複合体が検体液中の物質と接触が可能であるように容器内に充填されていることを特徴とするバイオセンサーを要旨とする。

ノ酸残基から79アミノ酸残基までのいずれかの範囲にある限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質とからなるタンパク質複合体を要旨とする。

- 5 多角体タンパク質が目的タンパク質に対して安定性向上または保護または保存性向上または、それらのいずれかの組み合わせ効果をもたらしており、その場合、本発明は、昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質の限定された領域、具体的にはVP3のN末端から40アミノ酸残基までと41アミノ酸残基から79ア
- 10 ミノ酸残基までのいずれかの範囲にある限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質とからなり、多角体タンパク質が目的タンパク質に対して安定性向上または保護または保存性向上または、それらのいずれかの組み合わせ効果をもたらしているタンパク質複合体を要旨とする。

15

- 目的タンパク質が、蛍光または発光機能を有するタンパク質、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、受容体、および生理活性タンパク質からなる群から選ばれた少なくとも1種であり、その場合、本発明は、昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻
- 20 タンパク質の限定された領域、具体的にはVP3のN末端から40アミノ酸残基までと41アミノ酸残基から79アミノ酸残基までのいずれかの範囲にある限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する、蛍光または発光機能を有するタンパク質、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、受容体、および生理活性タンパク質からなる群から選ばれた少なくとも1種である
- 25 目的タンパク質とからなるタンパク質複合体、好ましくは多角体タンパク質が目的タンパク質に対して安定性向上または保護または保存性向



また、本発明は、昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質の限定された領域、具体的にはVP3のN末端から40アミノ酸残基までと41アミノ酸残基から79アミノ酸残基までのいずれかの範囲にある限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質、具体的には蛍光または発光機能を有するタンパク質、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、受容体、および生理活性タンパク質からなる群から選ばれた少なくとも1種である目的タンパク質とからなるタンパク質複合体、好ましくは多角体タンパク質が目的タンパク質に対して安定性向上または保護または保存性向上または、それらのいずれかの組み合わせ効果をもたらしているタンパク質複合体が容器内に充填された固定化酵素を要旨とする。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、VP3遺伝子を短くするための方法とトランスファーベクターの作成を説明する図面である。

第2図は、短所化されたVP3遺伝子とそれによってコードされたアミノ酸残基の関係を示す図面である。

第3図は、短小化されたVP3遺伝子をEGFP遺伝子に導入し、これによってコードされたタンパク質が多角体の中に包囲されているかどうかを多角体からの緑色蛍光の有無によって測定したものである。

第4図は、短小化されたVP3の配列をそのN末端に持つEGFPが、多角体に包囲された状態で観察された緑色蛍光の強度を示したものである。蛍光強度の強さは1+、2+、3+、4+、5+の5段階表記した。

第5図は、VP3の39アミノ酸残基から79アミノ酸残基までを多角体に包囲させるためのシグナルとして、これをCyclin-dependent kinase 5のN末端に導入した。このタンパク質を多角体に包囲させた後、スライ

ドガラスに貼付け、多角体表面上で抗原抗体反応を行わせたものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

5      本発明に係るタンパク質複合体は、昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質で、細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質VP3の限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質を包囲してなる。ここで、包囲とは、目的タンパク質が多角体タンパク質内に完全に包み込まれた状態と多角体タンパク質外に一部露出して埋入された状態とを含むことを意味する。また、複合体の形状としては、立方体、直  
10      方体、円柱などの定形や不定形の粒子状が含まれる。このことによって、包囲される目的タンパク質の量を増加させたり、目的タンパク質のサイズを大きくすることが出来、又生理活性機能や触媒機能などの機能を飛躍的に高めることができる。

15

本発明において、VP3の限定された領域は、N末端から40までに加え、41アミノ酸残基から79アミノ酸残基の範囲である。なお、手数がかかり非効率になるが、N末端から41アミノ酸残基から79アミノ酸残基の領域とその領域のN末端もしくはC末端に10アミノ酸残基付加したものも使用  
20      することは可能である。

さらに、目的タンパク質は、生体関連化学物質との結合の点を考慮すると酵素、抗原、抗体、受容体、サイトカインであり、光化学特性の点を考慮すると発光タンパク質であり、電子授受反応の点を考慮すると金属結合タンパク質、金属イオン含有酵素である。これらの目的タンパク  
25      質の特性の点を考慮するとこれらの中から選択し少なくとも1種である構成が好適である。

本発明に係るタンパク質複合体の製造方法は、VP3の限定された領域をシグナルとして有する目的タンパク質のDNAを組み込んだベクターと多角体タンパク質のDNAを組み込んだベクターとを同時またはともに昆虫細胞、動物細胞、植物細胞、無細胞などの細胞に導入した後、それぞれの細胞に適した条件で培養することからなる。このことによって、タンパク質複合体の機能を低下させることなく効率よく製造することができる。ただし、目的タンパク質のDNAを組み込んだベクターと多角体タンパク質のDNAを組み込んだベクターとは、プラスミドベクターやウイルスベクターなどであり、これらはそれぞれDNAを導入する細胞に適したものを選択すれば良い。

本発明のタンパク質複合体の用途としては、基盤上にタンパク質複合体を配列・固定することにより受容体とし、SPR、フォトンカウンターまたは水晶振動子などのトランスデューサーによって、光量または質量を電気信号に変換し、表示することにより、免疫センサー、遺伝子センサー、脂質センサーなどのバイオセンサーとして適用することができる。基盤の材質には、ガラス、プラスチック、金属などの使用が可能である。又、基盤とタンパク質多角体との接着手段に、ゼラチン、高分子ポリマーなどの接着剤の使用が可能である。

また、上記基盤に代えて、検体液が通過可能にした筒状の容器をもちいて、この容器内にタンパク質複合体を検体液中の物質と接触可能に充填することによりバイオセンサーとして適用することが出来る。

さらに、触媒能を有するプロテアーゼ、リパーゼ、エステラーゼなどの酵素のDNAを実施例1と同じ方法で粒子状タンパク質複合体となし、これを種々の形態の容器に充填することにより、触媒能を有する固定化

酵素として適用することが出来る。

本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

5

#### 実施例 1

本発明をより詳細に説明するために、実施例及び添付の図面に従ってこれを説明する。

##### ①多角体タンパク質を作るウイルスの作成

10 昆虫細胞 *Spodoptera Frugiperda* 由来の IPLB-Sf21-AE (Sf21) で多角体を作製する場合、カイコ細胞質多角体病ウイルス (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) の立方体の多角体を形成させるために BmCPV の H 系統の多角体タンパク質遺伝子を組み込んだ組換えウイルス (AcCP-H) (Mori et al. (1993) J. Gen. Virol. 74, 99-  
15 102) を接種した。この AcCP-H は *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) 由来のバキュロウイルスベクターの polyhedrin プロモーターの下流に H 系統の多角体タンパク質遺伝子を組み込んだ組換えウイルスである。

20 ②外殻タンパク質 VP3 の限定された領域のみからなるシグナルの解析

##### 1) 外殻タンパク質 VP3 をコードする BmCPV S4 の短小化

プラスミド pVP3(XbaI)EGFP (国際公開 WO 02/36785A1 号) を制限酵素 XbaI で消化し、さらに制限酵素 KpnI で消化した。この DNA をチューブ内で ExoIII buffer 100  $\mu$ l に溶解し、ExonucleaseIII 1  $\mu$ l を  
25 加えて攪拌した後、25°C にてインキュベートした。この DNA 溶液を 30 秒ごとに 5  $\mu$ l ずつサンプリングし、別のチューブに用意しておいた MB

Nuclease Buffer 100  $\mu$ lに加えた。65°Cで5分間インキュベートして ExonucleaseIIIを失活させた後、37°Cに戻してMung Bean Nuclease 2  $\mu$ lを加え、37°Cで30分間インキュベートした。フェノール抽出、エタノール沈殿を行った後、DNAをKlenow Buffer 50  $\mu$ lに溶解して、Klenow  
5 Flagment 1  $\mu$ lを加えた。37°Cで15分間インキュベートして完全に末端修復した後、10  $\mu$ lを分取して、別のチューブに用意しておいた Ligation Solution A 100  $\mu$ lに加えた。さらに、Ligation Solution B 12  $\mu$ lを加えて攪拌し、16°Cで3時間反応させてエタノール沈殿および  
10 リンスを行った。回収したDNAを制限酵素XbaIで1時間消化した後、100  $\mu$ lのコンピテントセルJM109に入れ形質転換させた。なお、以上の操作は例えばKilo-Sequence用Deletion Kit (TaKaRa社製) を用い、そのプロトコールに従って行ったものである (第1図)。

## 2) リコンビナントトランスファーベクターの構築

形質転換した大腸菌はカナマイシンを含む2×TYプレートに撒いて37  
15 °Cで一晩培養し、生じたコロニーをカナマイシン含有2×TY培地にて37 °Cで一晩培養した。プラスミドDNAを抽出した後、制限酵素BglIIIおよび BamHIで消化し、電気泳動を行った。DNA断片が短くなっていることを確認し、さらにシーケンス解析を行い、そのDNA断片の塩基配列を確認した。塩基配列の確認によって必要となったプラスミドDNA溶液を制限  
20 酵素NotIで消化し、バキュロウイルスベクターのトランスファーベクターpVL1392 (PHARMINGEN社製) のNotI部位に挿入した。これを100  $\mu$ lのコンピテントセルJM109に形質転換させ、アンピシリンを含む2×TYプレートに撒いて37°Cで一晩培養した。生じたコロニーをアンピシリン含有2×TY培地にて37°Cで一晩培養し、プラスミドDNAを抽出し、シーケン  
25 ス解析を行った。解析の結果、インサートが正しい方向に挿入されているものを選択し、リコンビナントトランスファーベクター

pAcVP3(x)/EGFP（ただしxはBmCPVのVP3をコードする S4 cDNAの塩基数をあらわす）とした（第2図）。

### 3) リコンビナントバキュロウイルスの構築

構築したリコンビナントトランスファーベクターpAcVP3(x)/EGFP の  
5 それぞれ5  $\mu$ gを0.5  $\mu$ gの線状のBaculogold Baculovirus DNA  
（PHARMINGEN社製）と同時にリポフェクション法により昆虫培養細胞Sf21  
にトランスフェクションを行った。その後ブランク純化を行い、リコンビ  
ナントウイルスAcVP3(x)/EGFPを作製した。

## 10 ③EGFPを目的タンパク質とするタンパク質複合体の作成

### 1) Sf21細胞におけるリコンビナントタンパク質の発現

対照としてAcVP3/GFP（Ikeda et al. (2001) J. Virol. 75, 988-  
995）とAcCP-H（Mori et al. (1993) J. Gen. Virol. 74, 99-102）の  
ダブル感染やAcVP3(XbaI)/GFP（国際公開WO 02/36785A1号）  
15 とAcCP-Hのダブル感染を行った。一方、VP3の短小化を目的として  
AcVP3(x)/GFPとAcCP-Hのダブル感染を行った。これらのダブル感染はそ  
れぞれ10 p.f.u./cellで行った。ウイルスを1時間室温で細胞に吸着さ  
せた後、ウイルス液を除去し、2mlの10%仔ウシ胎児血清を含むTC-100  
を加え27°Cで4日間インキュベートした。

### 20 2) 多角体の精製

4日目の感染細胞から立方体の多角体を回収した、PBS（20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, pH7.2）で洗った後、氷中でホモジナイザ  
ーを用いて磨砕した。磨砕液は1%のTween20で洗浄後、遠心により多角  
体を回収した。さらに1.5M-2.2Mの蔗糖を用いた密度勾配法で50,000 X  
25 gで45分間遠心し、多角体の分画を抽出した。抽出したサンプルはPBS  
で洗浄した後、15,000 X gで10分間遠心して精製した多角体を回収した。

### 3) 多角体へのEGFP包囲の測定

AcVP3(x)/GFPとAcCP-Hおよび対照としてAcVP3/GFPとAcCP-Hのダブル感染やAcVP3(XbaI)/GFPとAcCP-Hのダブル感染した細胞から多角体を精製し蛍光顕微鏡（OLYMPUS-IX71社製）を用いて、多角体へのEGFPの包囲を、多角体からの蛍光の有無によって判別した（第3図）。その結果、いずれの場合にも多角体からの緑色蛍光が観察され、多角体の中にVP3/GFPやVP3(XbaI)/GFPが包囲されることを確認した。

次に、第2図に示す通りに作製したAcVP3(x)/GFPについてすべて、多角体へのEGFPの包囲を調べた。その結果、VP3遺伝子の5'末端から250塩基までを含む領域をEGFP遺伝子の5'末端に導入したキメラ遺伝子によってコードされるVP3(250)/GFP分子は多角体の中に包埋されることがわかった。すなわち、VP3のN末端の79アミノ酸残基までの領域にタンパク質分子を多角体の中に特異的に包埋するためのシグナル（多角体包埋シグナル）が存在することを意味し、このシグナルの存在によって、VP3(250)/GFP分子は多角体に包囲され、その結果、第3図に見られるように多角体からの緑色蛍光を観察することができた。

しかし、VP3遺伝子の5'末端から130塩基までをEGFP遺伝子の5'末端に導入したキメラ遺伝子の場合、このキメラ遺伝子によってコードされる融合GFP分子VP3(130)/GFPは、多角体に包囲される機能を消失しており、多角体からの緑色蛍光は全く観察されなかった（第3図）。これは、VP3のN末端の39アミノ酸残基までの領域には多角体包埋シグナルが存在しないことを示している。

さらにVP3の135塩基から292塩基までをPCR法により増幅させ、これをEGFP遺伝子の5'末端に導入したキメラ遺伝子を作製した。この結果、これはVP3のN末端の41アミノ酸残基から93アミノ酸残基をコードする領

域がEGFPのN末端に導入されることになる。同様にこのVP3(135-292)/EGFPが多角体の中に包囲されるかどうかを確認したところ、多角体からの緑色蛍光が観察された。

5 以上の結果から、VP3を介して多角体にタンパク質分子が包埋されるには、VP3のN末端の極限られた領域、すなわちVP3のN末端41アミノ酸残基から79アミノ酸残基までの範囲が多角体包埋シグナルとして機能することがわかった。

#### VP3を短くすることの効果

10 VP3遺伝子の5'末端から、様々な長さの領域をコードする遺伝子をGFP遺伝子の5'末端に導入することによって、GFPのN末端にVP3由来の様々なアミノ酸配列の領域を導入した。このキメラ遺伝子から発現した融合GFP分子による緑色蛍光の発色を比較した。その結果、第4図に示す通り、GFPのN末端に導入されるVP3の領域が短くなるにつれて、緑色  
15 蛍光の発色が増大した。しかし、VP3のN末端から79アミノ酸残基よりも短くした場合では、ほぼ同じ緑色蛍光の発色であった。このように、目的タンパク質に他のアミノ酸配列を導入した場合、その配列の長さが短くなるにつれ目的タンパク質の生理活性が高くなる。しかし、その配列が必要以上に短くなるとそのシグナルとしての機能が失われる。

20 本発明で得られたVP3の多角体に目的タンパク質を包囲させるためのシグナルは、目的タンパク質分子に導入した場合、その目的タンパク質を多角体の中に包囲させるのに十分な機能を有し、なおかつ、その目的タンパク質の生理活性の妨げとはならない長さであった。さらに、本発明によりVP3の長さを短くしたことによって、その削除した分だけ大きな分子を多角体に包埋できることを示しており、本発明の効果は高い。  
25



次に、実施例 1 の手順に従い、目的タンパク質として人由来の Cyclin-dependent kinase (CDK 5) を適用した、一辺が約 10 ミクロンの立方体のタンパク質複合体を用いたバイオセンサについて説明する。

## 5 実施例 2

スライドガラス上に複合体を並べバイオセンサを作成する。

スライドガラスにゼラチン溶液（ゼラチン 0.5、Crk 0.02）を 5  $\mu$ l 滴下した。なお、Crk は CHROMIUM POTASSIUM SULFATE（防腐剤）である。

- 10 新しいスライドガラスと表側どうしを静かに合わせ、溶液が広がったらゆっくり両側に引いた。ゼラチンが完全に乾いたら、よく攪拌した複合体溶液を 1  $\mu$ l 滴下し、その後乾燥させバイオセンサを作成した。このセンサを使用するまで蒸留水中に浸漬しておく。

- 15 なお、複合体溶液とは Sf21 細胞内で大量発現させた複合体を精製し、蒸留水に懸濁したものを指す。

## 検証

### 検証方法

#### ① ペルオキシダーゼ活性の抑制

- 20 複合体を滴下した部分に過酸化水素溶液（PBS で終濃度 1 % に調節）をのせ、15 分間室温で処理後、PBS で洗浄（過酸化水素溶液がのこさないため）した。

これによって、バックグラウンドとなるペルオキシダーゼ活性を抑制した。

- 25 ② 正常血清ブロッキング（5 % NHS）

正常ウマ血清を 0.3 % Triton X-100 を含む PBS（T-PBS）で終濃

度 5 % になるように調節し、添加した。室温で 20 分間経過後、T-PBS で洗浄。

③一次抗体反応

5 5 % 血清を含む T-PBS で抗 Cdk 5 モノクローナル抗体を 100 倍希釈し、  
37 °C 3 時間反応させた。その後 T-PBS で洗浄。

④ビオチン標識抗マウス IgG 抗体反応

ビオチン標識した二次抗体を T-PBS で 100 倍希釈し、37 °C で 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄。

10 一方、ABC 反応に使用する A 液、B 液を T-PBS で 100 倍希釈し、少なくとも 30 分は反応させておく。

⑤ABC 試薬との反応 (VECTASTAIN ABC KIT STANDARD PK-6100)

室温で一時間反応させた後、T-PBS で洗浄した。

⑥洗浄

15 次の DAB はリン酸と反応して沈殿を形成するので、PBS を置き換えるために、50 mM TRIS-HCl (pH 7.5) で軽く洗浄し、液を置換した。

⑦DAB 基質とのインキュベーション

50 mM Tris-HCl 溶液に DAB 粉末を 50 mg/ml の濃度になるよう添加し、さらに 16  $\mu$ l の過酸化水素水を加え、室温で 25 分間反応させた。反応終了後、50 mM Tris-HCl 溶液中に浸けた。

20 ⑧グリセリン PBS での封入

スライドガラスが乾いたらグリセリン PBS をサンプル上に一滴おとして、うえからカバーガラスを気泡が入らない様にのせた。

上記の検証方法を用いて、目的タンパク質が包囲されたタンパク質複  
25 合体と何もタンパク質を包囲していない多角体に抗原・抗体反応を試みた。その結果は第 5 図に示すように Cdk5 を包囲したタンパク質複合体で

は、その表面上でCdk5分子と抗Cdk5抗体に対する抗原・抗体反応を見ることができた。このように、融合目的タンパク質を包囲したタンパク質複合体の表面上で抗原抗体反応、すなわち抗原タンパク質と抗体タンパク質との間におけるタンパク質分子間相互作用を見ることができる。

5

#### 産業上の利用可能性

以上、詳しく説明したとおり、本発明によって、本来昆虫ウイルスが封入される多角体を構成するタンパク質である多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質VP3の限定された領域のみをシグナルとして、これを目的タンパク質に導入することにより、多角体タンパク質と目的タンパク質からなるタンパク質複合体を効率よく生産できる。

又、酵素活性、抗原・抗体反応、タンパク質間相互作用などの生理活性機能を有するタンパク質分子を多角体タンパク質によって包囲することによって得られたタンパク質複合体は、優れたバイオセンサーや固定化酵素としての使用が可能である。

20

25

## 請 求 の 範 囲

1. 昆虫ウイルスが封入される多角体タンパク質と細胞質多角体病ウイルスの外殻タンパク質VP3の限定された領域を多角体包埋シグナルとして有する目的タンパク質とからなるタンパク質複合体。  
5
2. VP3の限定された領域が、N末端から40アミノ酸残基までと41アミノ酸残基から79アミノ酸残基までのいずれかの範囲にある請求項1記載のタンパク質複合体。
3. 多角体タンパク質が目的タンパク質に対して安定性向上または保護または保存性向上または、それらのいずれかの組み合わせ効果をもたらしている請求項1のタンパク質複合体。  
10
4. 目的タンパク質が、蛍光または発光機能を有するタンパク質、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、受容体、および生理活性タンパク質からなる群から選ばれた少なくとも1種である請求項1記載のタンパク質複合体。  
15
5. 目的とするタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだベクターを、多角体タンパク質遺伝子を組み込んだベクターとともに細胞に感染させた後、この細胞を培養して、その中で目的とするタンパク質と多角体タンパク質からなる複合構造のタンパク質複合体を製造するタンパク質複合体の製造方法。  
20
6. 請求項1ないし4のいずれかに記載のタンパク質複合体を基盤上にドット状または線上に配列、固定したことを特徴とするバイオセンサー。
7. 請求項1ないし4のいずれかに記載のタンパク質複合体が基盤上に形成した凹み検体液中の物質と接触が可能であるように充填されていることを特徴とするバイオセンサー。  
25

8. 請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載のタンパク質複合体が検体液中の物質と接触が可能であるように容器内に充填されていることを特徴とするバイオセンサー。

9. 請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載のタンパク質複合体の目的タンパク質が酵素である容器に充填された固定化酵素。

10

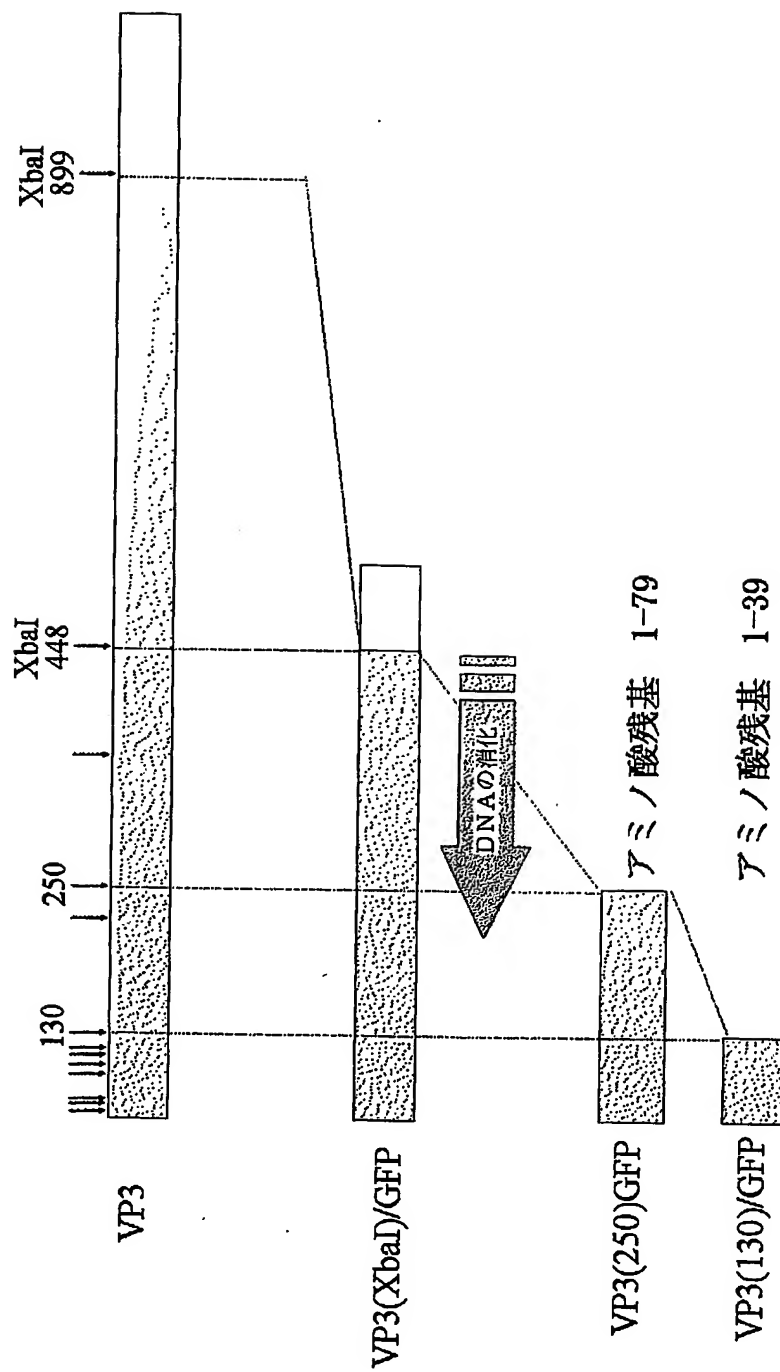
15

20

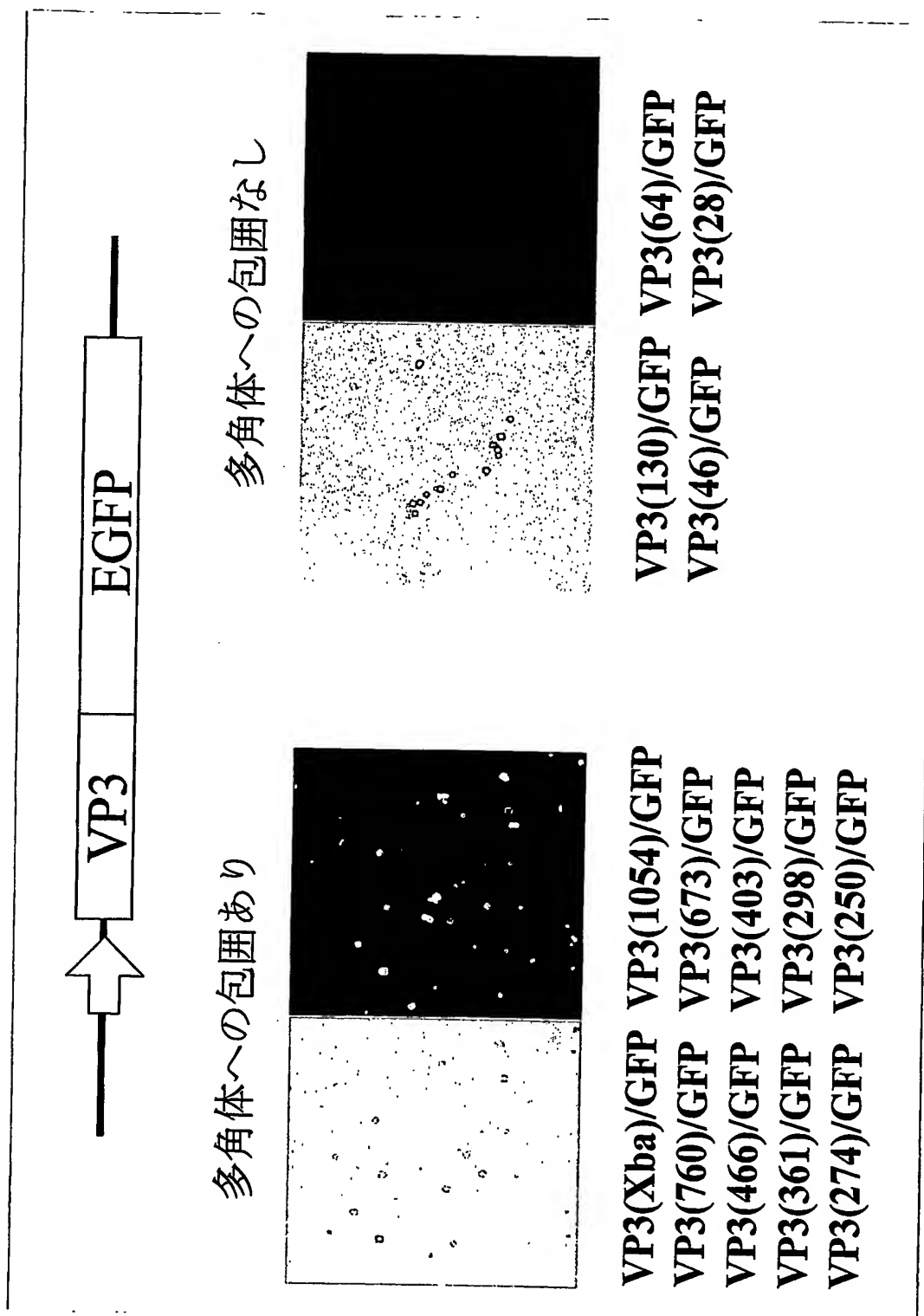
25



第2図



## 第3図





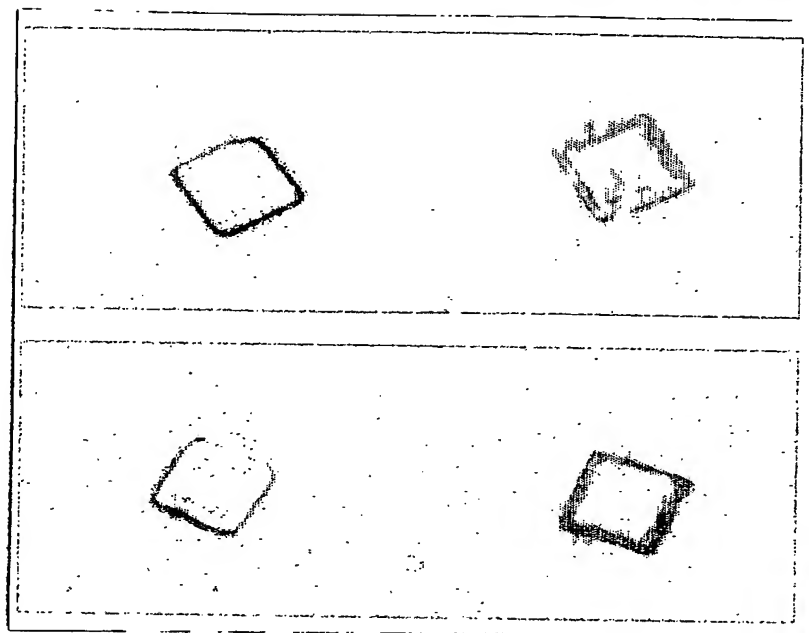
## 第4図

短小化したVP3	アミノ酸残基数	蛍光強度
VP3(1054)/GFP	347	1+
VP3(760)/GFP	249	1+
VP3(673)/GFP	220	1+
VP3(466)/GFP	151	2+
VP3(403)/GFP	130	2+
VP3(361)/GFP	116	3+
VP3(298)/GFP	95	4+
VP3(274)/GFP	87	5+
VP3(250)/GFP	79	5+

## 第5図

多角体

Cdk5 を包囲した多角体



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000032

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N11/00, C07K14/01, C07K19/00, C12P21/02, G01N33/53, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N11/00, C07K14/01, C07K19/00, C12P21/02, G01N33/53, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 02/36785 A1 (Protein Crystal Co., Ltd.), 10 May, 2002 (10.05.02), Full text (Family: none)	1-5/6-9
X/Y	IKEDA, K. et al., Molecular characterization of Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4., J.Virol.(2001), Vol.75, No.2, pages 988 to 995	1-5/6-9
Y/A	WO 00/04382 A1 (ZYOMIX INC.), 27 January, 2000 (27.01.00), Full text & AU 9951025 A & EP 1097380 A1 & JP 2002-520618 A	6-9/1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search  
13 February, 2004 (13.02.04)

Date of mailing of the international search report  
02 March, 2004 (02.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000032

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 98/18006 A1 (GENENOVA CORP.), 30 April, 1998 (30.04.98), Full text & ZA 9709333 A & AU 9748964 A & EP 939901 A1 & JP 2001-502803 A	6-9/1-5
Y/A	WO 96/38474 A2 (BIONOVA CORP.), 05 December, 1996 (05.12.96), Full text & AU 9659575 A & ZA 9604480 A & EP 828756 A2 & JP 11-50628 A & BR 9608676 A & MX 9709271 A1 & KR 99022114 A & US 6153378 A & AU 200055034 A & CN 1189838 A	6-9/1-5
Y/A	WO 95/17425 A2 (UNIV. CATHOLIQUE LOUVAIN), 29 June, 1995 (29.06.95), Full text & AU 9514146 A & EP 736042 A1 & JP 10-504097 A & US 5939270 A	6-9/1-5
A	HAGIWARA, K. et al., Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of Bombyx mori cypovirus 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively., J. Gen.Virol., 2002 June; 83(Pt 6): 1477-82	1-9
A	US 5753220 A (KATAKURA IND. CO., LTD.), 21 November, 1995 (21.11.02), Full text & JP 7-303488 A	1-9
A	JP 2002-306167 A (Japan Science and Technology Corp.), 22 October, 1995 (22.10.95), Full text (Family: none)	1-9
A	WO 98/28424 A2 (IMMUNEX CORP.), 02 July, 1998 (02.07.98), Full text & AU 9857184 A & EP 946725 A2 & AU 200020619 A & JP 2002-509431 A	1-9
A	WO 00/34485 A2 (CONKLIN D C), 15 June, 2000 (15.06.00), Full text & AU 200045192 A & EP 1137783 A2 & JP 2002-531131 A & MX 2001005834 A1	1-9

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C12N 11/00, C07K 14/01, C07K 19/00, C12P 21/02, G01N 33/53, G01N 37/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C12N 11/00, C07K 14/01, C07K 19/00, C12P 21/02, G01N 33/53, G01N 37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 02/36785 A1 (株式会社プロテインクリスタル) 2002. 05. 10, 全文 (ファミリーなし)	1-5/6-9
X/Y	IKEDA, K. et al., Molecular characterization of Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4, J Virol. (2001) Vol. 75, No. 2, p. 988-995	1-5/6-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 02. 2004

国際調査報告の発送日

02. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	WO 00/04382 A1 (ZYOMIX INC) 2000. 01. 27, 全文 & AU 9951025 A & EP 1097380 A1 & JP 2002-520618 A	6-9/1-5
Y/A	WO 98/18006 A1 (GENENOVA CORP) 1998. 04. 30, 全文 & ZA 9709333 A & AU 9748964 A & EP 939901 A1 & JP 2001-502803 A	6-9/1-5
Y/A	WO 96/38474 A2 (BIONOVA CORP) 1996. 12. 05, 全文 & AU 9659575 A & ZA 9604480 A & EP 828756 A2 & JP 11-506328 A & BR 9608676 A & MX 9709271 A1 & KR 99022114 A & US 6153378 A & AU 200055034 A & CN 1189838 A	6-9/1-5
Y/A	WO 95/17425 A2 (UNIV CATHOLIQUE LOUVAIN) 1995. 06. 29, 全文 & AU 9514146 A & EP 736042 A1 & JP 10-504097 A & US 5939270 A	6-9/1-5
A	HAGIWARA, K. et al., Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of Bombyx mori cypovirus 1 encoding puta tive capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively. J Gen Virol. 2002 Jun;83(Pt 6):1477-82.	1-9
A	US 5753220 A (KATAKURA IND CO LTD) 1995. 11. 21, 全文 & JP 7-303488 A	1-9
A	JP 2002-306167 A (科学技術振興事業団) 2002. 10. 22, 全文 (ファミリーなし)	1-9
A	WO 98/28424 A2 (IMMUNEX CORP) 1998. 07. 02, 全文 & AU 9857184 A & EP 946725 A2 & AU 200020619 A & JP 2002-509431 A	1-9
A	WO 00/34485 A2 (CONKLIN D C) 2000. 06. 15, 全文 & AU 200045192 A & EP 1137783 A2 & JP 2002-531131 A & MX 2001005834 A1	1-9